

Hesperidin meningkatkan efek sitotoksik doxorubicin pada sel MCF-7

Hesperidin increase cytotoxic effect of doxorubicin in MCF-7 cells

Adam Hermawan^{1*)}, Edy Meiyanto² dan Ratna Asmah Susidarti²

¹ Cancer Chemoprevention Research Center

² Fakultas Farmasi, Universitas Gadjah Mada

Abstrak

Hesperidin, senyawa flavonoid menunjukkan efek toksik pada beberapa sel kanker. Tujuan penelitian ini adalah untuk mengetahui aktivitas sitotoksik hesperidin tunggal dan kombinasinya dengan doxorubicin pada sel MCF-7. Viabilitas sel perlakuan hesperidin, doxorubicin dan kombinasinya ditetapkan dengan uji MTT. Pengamatan apoptosis dilakukan dengan metode double staining menggunakan Ethidium Bromide-Acridine Orange. Hesperidin belum menunjukkan efek sitotoksik namun doxorubicin memberikan efek sitotoksik dengan IC₅₀ 467 nM. Perlakuan hesperidin (5, 50 dan 100 µM) meningkatkan efek sitotoksik doxorubicin 200 nM dibandingkan perlakuan doxorubicin tunggal. Efek sitotoksik terbesar diperoleh pada kombinasi doxorubicin 200 nM dan hesperidin 100 µM. Kombinasi doxorubicin 200 nM dan hesperidin 100 µM juga menunjukkan pemacuan apoptosis sel MCF-7. Hesperidin potensial untuk dikembangkan sebagai agen ko-kemoterapi pada kanker payudara, namun mekanisme molekulernya masih perlu diteliti lebih lanjut.

Kata kunci : Hesperidin, doxorubicin, sinergisme, MCF-7, apoptosis

Abstract

Hesperidin, a flavonoid, shows strong cytotoxic effect in several cancer cell lines. The aim of this research was to investigate cytotoxic activities of hesperidin alone and in combination with doxorubicin. Cell viability assay of hesperidin, doxorubicin, and combination treatments were carried out by using MTT assay. Apoptosis assay was done using double staining method using Ethidium Bromide-Acridine Orange. Hesperidin did not show cytotoxic effect but doxorubicin showed cytotoxic effect with IC₅₀ 467 nM. Hesperidin (5, 50 and 100 µM) increased cytotoxic effect of doxorubicin compared with doxorubicin alone. The strongest cytotoxic activity was showed by the combination of 200 nM doxorubicin and 100 µM hesperidin. Combination treatment of doxorubicin 200 nM and hesperidin 100 µM induced apoptosis in MCF-7 cells. Hesperidin is potentially to be developed as co-chemotherapeutic agent for breast cancer, while molecular mechanism need to be explored.

Key words: Hesperidin, doxorubicin, synergism, MCF-7, apoptosis

Pendahuluan

Yayasan Kesehatan Payudara Jakarta (YKPP) RS. Kanker Dharmas menyebutkan bahwa kanker payudara merupakan penyebab kematian nomor 2 untuk perempuan di Indonesia (Anonim, 2009). Berbagai cara telah ditempuh untuk pengobatan kanker payudara antara lain

pembedahan, kemoterapi, terapi hormon, dan terapi radiasi. Doxorubicin adalah agen kemoterapi yang umum dipakai untuk terapi kanker payudara, namun efektivitas penggunaan agen kemoterapi ini menjadi terbatas karena munculnya masalah resistensi sel kanker dan adanya efek toksik pada jaringan normal tubuh

(Fimognari *et al.*, 2006). Untuk mengatasi masalah resistensi sel kanker dan meningkatkan efektivitas agen kemoterapi salah satu cara yang dapat ditempuh adalah kombinasi dengan agen kemopreventif sehingga dapat memberikan respon yang lebih baik dibandingkan penggunaan tunggalnya (Fimognari *et al.*, 2006).

Senyawa turunan flavonoid menunjukkan aktivitas antitumor dan juga merupakan kandidat *multidrug resistance-reversing agent* dalam kemoterapi kanker (Ikegawa *et al.*, 2002). Salah satu senyawa flavonoid yang berpotensi sebagai agen ko-kemoterapi dengan penghambatan proliferasi dan pemacuan apoptosis adalah hesperidin. Hesperidin menunjukkan efek sitotoksik pada sel Caco-2, CEM/ADR5000 dan CCRF-CEM dengan IC_{50} masing-masing 195, 230 dan 95 μ M (El-Readi *et al.*, 2009). Hesperidin dilaporkan dapat menghambat aktivitas *tyrosinase* *diphenolase* yang berperan dalam proses melanogenesis pada sel melanoma tikus dengan IC_{50} 16,08 μ M (Zhang *et al.*, 2007). Hesperidin juga mampu memperbaiki kondisi histologi testis, serta memperbaiki fungsi enzim *lactate dehydrogenase* (LDH-X), *superoxide dismutase* (SOD), dan *glutathione-S-transferase* (GST) pada testis tikus yang dipejani Benzo[a]piren (Arafa *et al.*, 2009). Hesperidin juga mampu menghambat proliferasi sel MCF-7 yang ditransfeksi dengan *green fluoresens protein* (GFP)/*alpha-tubulin* (MCF-7-GFP-Tubulin) (Lee *et al.*, 2009). Namun, penelitian mengenai kombinasi hesperidin dengan doxorubicin pada sel MCF-7 belum pernah dilakukan.

Salah satu model sel kanker payudara yang telah mengalami resistensi terhadap agen kemoterapi doxorubicin adalah sel MCF-7 (Simstein *et al.*, 2003). Sel kanker MCF-7 memiliki karakteristik overekspresi PgP (Davis *et al.*, 2003), overekspresi Bcl-2 dan tidak mengekspresikan caspase-3 sehingga mampu menghindari apoptosis (Simstein *et al.*, 2003). Penelitian ini akan

menguji apakah hesperidin mempunyai efek sinergis dengan agen kemoterapi doxorubicin sehingga dapat mengatasi permasalahan resistensi dan menurunkan dosis efektif doxorubicin sehingga dapat mengurangi toksisitas agen kemoterapi tersebut.

Metodologi

Bahan

Hesperidin (murni HPLC 80 % No Katalog H5254-25G) diperoleh dari Sigma (Sigma Aldrich Chemie GmbH, Steinheim, Germany). Doxorubicin diperoleh dari Ebewe, PT. Ferron Par Pharmaceutical. Hesperidin dan Doxorubicin dilarutkan dalam *Dimethyl Sulfoxide* (DMSO) (Sigma). Sel kanker payudara MCF-7 merupakan koleksi *Cancer Chemoprevention Research Center* Fakultas Farmasi UGM.

Kultur sel ditumbuhkan dalam media penumbuh *Dulbecco's modified Eagle's medium* (DMEM) yang mengandung *Foetal Bovine Serum* (FBS) 10 % (v/v) (Gibco), penisillin-streptomisin 1 % (v/v) (Gibco). Selain bahan-bahan di atas juga digunakan 0,025 % trypsin-EDTA (Gibco) untuk melepas sel yang melekat pada *flask* maupun *plate*, PBS.

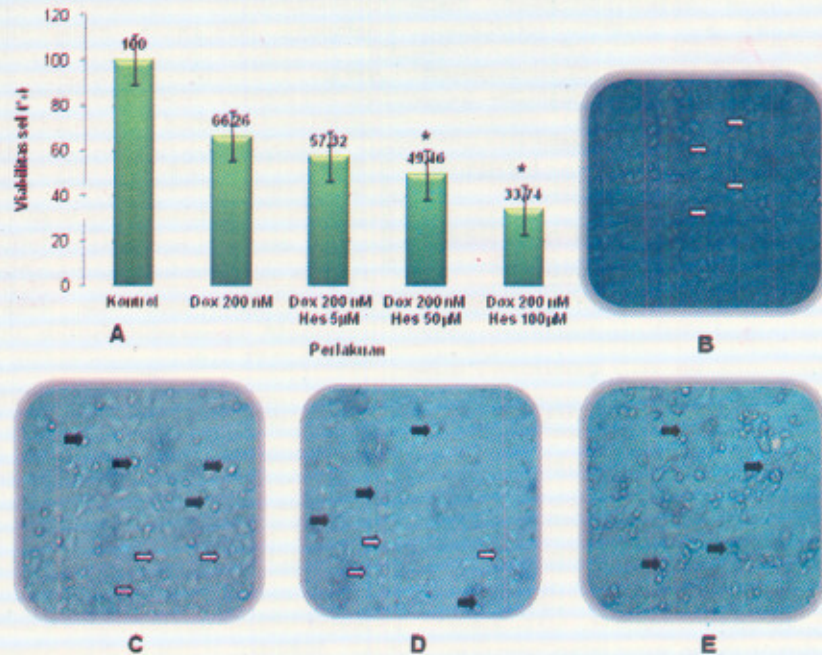
Pengamatan viabilitas sel dilakukan dengan MTT [3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5 difeniltetrazolium bromida] (Sigma), dengan konsentrasi 5 mg/mL. *Stopper* yang digunakan adalah natrium dodesil sulfat dalam 0,1 N HCl.

Pengamatan apoptosis dilakukan dengan pengecatan menggunakan pereaksi etidium bromida-akridin oranye (EtBr-AO). Larutan induk dibuat dari 50 mg etidium bromida (Sigma, Sigma-Aldrich Corp, St. Louis, MO, USA) dan 15 akridin oranye (Sigma, Sigma-Aldrich Corp, St. Louis, MO, USA) dilarutkan dalam 1 mL etanol 95 %, ditambah akuades hingga 50 mL. Sebelum pemakaian, 1 mL larutan induk diencerkan dengan PBS sampai volume 100 mL.

Bahan-bahan yang digunakan selama penelitian apabila tidak dikatakan lain berarti berderajat pro analisis.

Uji ko-kemoterapi menggunakan metode MTT

Sel MCF-7 dengan konsentrasi 5×10^3 sel/sumuran didistribusikan ke dalam *plate* 96 sumuran dan diinkubasi selama 24 jam untuk



Gambar 2. Efek kombinasi hesperidin dengan doxorubicin terhadap viabilitas sel MCF-7.

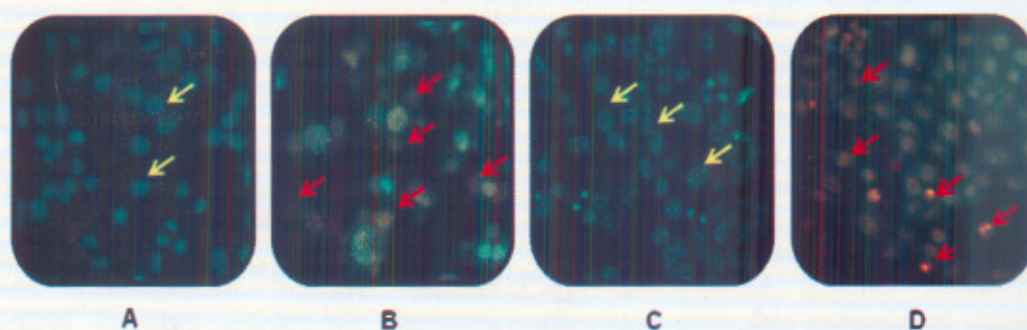
Profil viabilitas sel disajikan dari rata-rata \pm standard error (SE) dari 3 eksperimen. A, B, C, D dan E berturut-turut adalah foto morfologi sel setelah diberi perlakuan pelarut (kontrol) doxorubicin 200 nM, perlakuan kombinasi hesperidin 50 μ M dan doxorubicin 200 nM, dan kombinasi hesperidin 100 μ M dan doxorubicin 200 nM.

Metabolisme doxorubicin juga dapat terjadi pada sel inang dengan mekanisme yang sama dengan metabolisme pada sel kanker. Powell and McCay (1995) menyebutkan bahwa secara *in vitro* doxorubicin akan dikatalisis oleh enzim mikrosomal tikus membentuk metabolit yang dapat menginisiasi peroksidasi lipid pada membran sel. Perubahan permeabilitas membran sel MCF-7 ini akan memudahkan masuknya hesperidin ke dalam sel. Namun hal ini masih perlu dibuktikan dengan penelitian lebih lanjut.

Perlakuan hesperidin (Gambar 3C) belum menunjukkan pemacuan apoptosis jika dibandingkan kontrol sel (Gambar 3A). Hal ini mungkin disebabkan konsentrasi hesperidin yang masih terlalu rendah, meskipun demikian sudah mampu mengubah morfologi sel jika dibandingkan dengan sel normal. Perlakuan doxorubicin

(Gambar 3B) belum menyebabkan apoptosis pada semua sel yang terlihat dari beberapa sel yang masih berfluoresensi hijau, sedangkan kombinasinya dengan hesperidin (Gambar 3D) menyebabkan pemacuan apoptosis yang lebih kuat. Pemacuan kematian sel dengan mekanisme apoptosis sangat menguntungkan karena nantinya tidak akan menimbulkan respon inflamasi terhadap pasien. Apoptosis juga dipacu oleh suatu mekanisme sitotoksik yang memiliki selektivitas lebih baik terhadap sel kanker. Pada perlakuan kombinasi terbukti bahwa hesperidin dapat meningkatkan kemampuan doxorubicin dalam memacu apoptosis sel kanker payudara MCF-7.

Resistensi sel MCF-7 terhadap agen kemoterapi doxorubicin dapat terjadi melalui berbagai mekanisme. Perlakuan doxorubicin pada sel MCF-7 menunjukkan adanya ekspresi PgP secara berlebihan



Gambar 3. Efek perlakuan hesperidin tunggal dan kombinasinya terhadap pemacuan apoptosis pada sel MCF-7.

Sel MCF-7 diberi perlakuan dengan pelarut (A), doxorubicin 200 nM, (B), hesperidin 100 μ M, (C) dan kombinasi hesperidin 100 μ M – doxorubicin 200 nM (D) dan dilakukan pengecatan DNA dengan pereaksi EA, kemudian diamati dibawah mikroskop fluoresen dengan perbesaran 400 x. \leftarrow sel hidup berfluoresensi hijau; \leftarrow sel apoptosis berfluoresensi merah.

(Mealey *et al.*, 2002). Transport obat dengan PgP ini memerlukan ATP untuk mengusir obat keluar sel (Chung *et al.*, 2005), akibatnya konsentrasi agen kemoterapi dalam sel akan turun dan menurunkan efektivitas agen kemoterapi. Kuatnya pemacuan apoptosis oleh kombinasi hesperidin dan doxorubicin ini diperantarai oleh penghambatan aktivitas maupun ekspresi PgP. Doxorubicin tunggal saja tidak mampu memacu apoptosis karena adanya aktivitas PgP yang menyebabkan konsentrasi doxorubicin dalam sel menjadi turun. Selain itu pemacuan apoptosis dapat dihambat akibat degradasi p53 oleh mdm2 yang diaktivasi oleh doxorubicin. Hesperidin berperan dalam penghambatan ekspresi PgP melalui penghambatan aktivasi NF- κ B maupun penghambatan aktivitas PgP. Protein NF- κ B adalah salah satu faktor transkripsi yang bertanggung jawab pada mekanisme resistensi sel kanker (Olivier *et al.*, 2006). Protein NF- κ B diekspresikan pada tingkat yang cukup tinggi pada proses malignansi kanker payudara (Shehata, 2005). Aktivasi NF- κ B juga akan meningkatkan transkripsi *MDR1*, suatu gen pengkode PgP akibatnya intake doxorubicin di dalam sel

kanker menjadi berkurang (Bourguignon *et al.*, 2009). Pencegahan resistensi obat dapat dilakukan dengan penekanan aktivasi dan ekspresi PgP. Senyawa flavonoid menekan aktivasi PgP dengan berikatan langsung dengan PgP sebagai substratnya (Nabekura *et al.*, 2008). Hesperidin terbukti mampu menghambat aktivitas PgP (El-Readi *et al.*, 2009). Hal ini juga didukung oleh penelitian secara *in silico* yang menunjukkan bahwa hesperidin dapat berikatan dengan PgP (Adina *et al.*, 2008) sehingga dapat menghambat kerja PgP dan akhirnya akan meningkatkan kerja doxorubicin pada sel MCF-7.

Doxorubicin 200 nM tidak menyebabkan penekanan ekspresi Bcl-2 pada sel MCF-7 (Meiyanto *et al.*, 2009). Peningkatan pemacuan apoptosis doxorubicin oleh hesperidin kemungkinan akibat penekanan Bcl-2 dan peningkatan ekspresi p53. Hesperidin 100 μ M terbukti menekan ekspresi Bcl-2 pada sel kanker kolon (Park *et al.*, 2008) sehingga kemungkinan mampu menekan ekspresi Bcl-2 pada sel MCF-7 yang akhirnya akan meningkatkan pemacuan apoptosis doxorubicin. Selain itu mekanisme

pemacuan apoptosis mungkin juga terjadi melalui peningkatan ekspresi p53 sebagai faktor transkripsi yang akan meningkatkan ekspresi Bax. Penelitian Li *et al.* (2007) menyebutkan bahwa doxorubicin 200 nM meningkatkan ekspresi Bax pada sel MCF-7. Penelitian lain juga menyebutkan bahwa hesperidin 100 μ M meningkatkan ekspresi protein Bax pada sel kanker kolon (Park *et al.*, 2008), sehingga kemungkinan juga mampu memberikan efek yang sama pada sel MCF-7 dalam menyebabkan peningkatan pelepasan sitokrom c, mengaktifasi jalur caspase dan menyebabkan peningkatan apoptosis (Simstein *et al.*, 2003). Namun hal ini masih perlu diteliti lebih lanjut.

Peningkatan pemacuan apoptosis oleh kombinasi hesperidin dan doxorubicin melalui penghambatan aktivasi NF- κ B juga dapat terjadi melalui penghambatan jalur MAP kinase dan PI3K. Hesperidin dapat menghambat aktivasi NF- κ B dengan menghambat jalur MAP kinase melalui penghambatan fosforilasi I κ B, JNK dan p38 (Yeh *et al.*, 2007). Selain itu, hesperidin kemungkinan juga dapat menghambat aktivasi NF- κ B melalui jalur PI3K. Penghambatan jalur PI3K selain menghambat aktivasi NF- κ B juga akan meningkatkan pemacuan apoptosis sel. Aktivasi jalur PI3K/Akt akan menghambat apoptosis melalui inaktivasi Bad (Gu *et al.*, 2004). Uji *in silico* dengan *docking* molekuler dilakukan antara hesperidin dengan PI3K menunjukkan bahwa hesperidin dapat menghambat PI3K secara kompetitif dengan ATP (Hastuti *et al.*, 2008) sehingga aktivasi NF- κ B melalui jalur Akt akan dihambat. Hal ini juga akan meningkatkan pemacuan apoptosis melalui stabilisasi Bad, namun masih perlu diteliti lebih lanjut.

Hesperidin sangatlah potensial untuk dikembangkan sebagai agen kokemoterapi doxorubicin pada terapi kanker payudara. Hesperidin ke depannya dapat digunakan

sebagai senyawa tunggal maupun dalam bentuk ekstrak. Pada ekstrak etanolik (70%) kulit jeruk Nipis yang masih mentah terkandung senyawa 112,57 mg naringin, 23,80 mg hesperidin, 0,6 mg hesperetin, 7,02 mg rutin, 0,92 mg nobiletin, dan 0,42 mg tangeretin per gram ekstrak (Choi *et al.*, 2007). Ekstrak etanolik kulit jeruk nipis yang banyak mengandung hesperidin juga telah terbukti mampu meningkatkan efek sitotoksik doxorubicin pada sel MCF-7 (Adina *et al.*, 2008).

Namun diperlukan penelitian lebih lanjut mengenai mekanisme molekuler yang terkait dengan regulasi daur sel maupun pemacuan apoptosis. Efek kombinasi agen kemoterapi dengan senyawa baru juga perlu dilihat pengaruhnya terhadap daur sel guna mendasari rancangan regimen terapi. Pada peristiwa pemacuan apoptosis oleh agen kemoterapi, kemampuan sel untuk menginduksi penghentian daur sel adalah salah satu faktor penyebab resistensi. Sehingga kombinasi agen kemoterapi dengan suatu agen yang dapat langsung memacu apoptosis tanpa perantara penghentian daur sel merupakan agen yang lebih baik daripada agen yang hanya bekerja pada penghambatan daur sel.

Kesimpulan

Hasil penelitian ini menunjukkan bahwa hesperidin meningkatkan efektivitas doxorubicin pada sel MCF-7 melalui mekanisme apoptosis. Meskipun demikian masih diperlukan penelusuran mekanisme molekuler lebih lanjut untuk dapat dikembangkan sebagai agen kokemoterapi.

Ucapan Terima Kasih

Terima kasih disampaikan kepada DIPA UGM yang mendanai penelitian ini melalui Program Penelitian Hibah Tim Pascasajana tahun 2009.

Daftar Pustaka

- Adina, A. B., Handoko, F. F., Setyarini, I. I., Septisetyani, E. P., Riyanto, S., and Meiyanto, E., 2008. Ekstrak Etanolik Kulit Jeruk Nipis (*Citrus aurantifolia* (Cristm.) Swingle) Meningkatkan Sensitivitas Sel MCF-7 terhadap Doxorubicin, *Proceeding, Kongres Ilmiah ISFI ke-16, Yogyakarta*, ISBN:978-979-95107-6-2, 55-62.
- Anonim, 2009, Yayasan Kesehatan Payudara Jakarta RS. Kanker Dharmais, <http://www.pitapink.com/id/salam.html>, diakses pada 20 Oktober.
- Arafa, H., Aly, H., Abd-Ellah, M., and El-Refaey, H., 2009. Hesperidin attenuates benzo[α] pyrene-induced testicular toxicity in rats via regulation of oxidant/antioxidant balance, *Toxicol Ind Health.*, 6, 417-427.
- Bourguignon, L. Y., Xia, W., and Wong, G., 2009. Hyaluronan-Mediated CD44 Interaction with p300 and SIRT1 Regulates Beta-catenin Signaling and NFkappaB-Specific Transcription Activity Leading to MDR1 and Bcl-xL Gene Expression and Chemoresistance in Breast Tumor Cells. *J. Biol Chem*, 284,2657-2671.
- Chiba, H., Uehara, M., Wu, J., Wang, X., Masuyama, R., Suzuki, K., Kanazawa, K., and Ishimi, Y., 2003. Hesperidin, a Citrus Flavonoid, Inhibits Bone Loss and Decreases Serum and Hepatic Lipids in Ovariectomized Mice, *Journal of Nutrition*, 133, 1892-1897.
- Choi, S., Ko, H., Ko, S., Hwang, J., Park, J., Kang, S., Han, S., Yun, S., and Kim, S., 2007. Correlation between Flavonoid Content and the NO Production Inhibitory Activity of Peel Extracts from Various Citrus Fruits, *Biol. Pharm. Bull.*, 30, 4, 772-778.
- Chung, S. Y., Sung, M. K., Kim, N. H., Jang, J. O., Go, E. J., and Lee, H. J., 2005. Inhibition of P-glycoprotein By Natural Products in Human Breast Cancer Cells, *Arch Pharm Res.*, 28, 823-828.
- Davis, J. M., Navolanic, P. M., Weinstein-Oppenheimer, C. R., Steelman, L. S., Wei H., Konopleva, M., Blagosklonny, M. V. and McCubrey, J. A., 2003. Raf-1 and Bcl-2 Induce Distinct and Common Pathways That Contribute to Breast Cancer Drug Resistance. *Clin. Canc. Res.* 9, 1161-1170.
- El-Readi, M. Z., Hamdan, D., Farrag, N., El-Shazly, A., and Wink, M., 2009. Inhibition of P-glycoprotein Activity by Limonin and Other Secondary Metabolites from Citrus Species in Human Colon and Leukaemia Cell Lines, *Eur. J. Pharmacol.*, doi:10.1016/j.ejphar.2009.09.040.
- Fimognari, C., Nusse, M. N., Lenzi, M., Sciuscio, D., Cantelli-Forti, G., Hrelia, P., 2006. Sulforaphane Increases the Efficacy of doxorubicin in mouse fibroblasts characterized by p53 mutations, *Mutation Research*, 601, 92-101.
- Gewirtz, D. A., 1999A. critical evaluation of the mechanisms of action proposed for the antitumor effects of the anthracycline antibiotics adriamycin and daunorubicin, *Biochem. Pharmacol.*, 57, 727-741.
- Gu, Q., Wang, D., Wang, X., Peng, R., Liu, J., Jiang, T., Wang, Z., Wang, S., and Deng, H., 2004. Basic fibroblast growth factor inhibits radiation-induced apoptosis of HUVECs. I. The PI3K/AKT pathway and induction of phosphorylation of BAD, *Radiat Res.*, 161, 692-702.

- Hastuti, N., Pratiwi, D., Armandari I., Nur W. Niken, Ikawati, M., Riyanto, S., and Meiyanto, E., 2008. Ekstrak Etanolik Kulit Jeruk Nipis (*Citrus aurantiifolia* (Cristm.) Swingle) Menginduksi Apoptosis Pada sel Payudara Tikus Galur Sprague Dawley Terinduksi 7,12-Dimetilbenz[a]antrasena, Proceeding Kongres Ilmiah XVI Ikatan Sarjana Farmasi Indonesia, ISBN: 978-979-95108-6-0, ISFI, 94 - 99.
- Ikegawa, T., Ohtani, H., Koyabu, N., Juichi, M., Iwase, Y., Ito, C., Furukawa, H., Naito, M., Tsuruo, T., and Sawada, Y., 2002. Inhibition of P-glycoprotein by flavonoid derivatives in adriamycin resistant human myelogenous leukemia (K562/ADM) cell., *Cancer Lett.*, 177, 89-93.
- Lee, C. J., Wilson, L., Jordan, M. A., Nguyen, V., Tang, J., and Smiyun, G., 2009. Hesperidin Suppressed Proliferations of Both Human Breast Cancer and Androgen-dependent Prostate Cancer Cells, *Phytother Res.*, In Press.
- Li, S., Zhou, Y., Wang, R., Zhang, H., Dong Y., and Ip, C., 2007. Selenium Sensitizes MCF-7 Breast Cancer Cells to Doxorubicin-Induced Apoptosis Through Modulation of Phospho-Akt and Its Downstream Substrates, *Mol Cancer Ther.*, 6:1031-1038.
- McGahon, A. J., Martin, S. J., Bissonnette, R. P., Mahboubi, M., Shi, Y., Mogil, R. J., Nishioka, W. K., and Green, D. R., 1995. The End of the (Cell) Line: Methods for the Study of Apoptosis *in Vitro*, in: Schwartz, L. M., Osborn, B. A., *Cell Death*, Academic Press, San Diego.
- Mealey, K. L., Barhoumi, R., Burghardt, R. C., Safe, S. and Kochevar, D. T., 2002. Doxycycline Induces Expression of P Glycoprotein in MCF-7 Breast Carcinoma Cells. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 46, 755-761.
- Meiyanto, E., Handayani, S., Septisetyani, E. P., and Susidarti, R. A., 2009. Synergistic Effect of Areca catechu L. Ethanolic Extract and Its Chloroform Fraction with Doxorubicin on MCF-7, *Jurnal Ilmu Kefarmasian Indonesia*, 7, 13-18.
- Minotti, G., Menna, P., Salvatorelli, E., Cairo, G. and Gianni, L., 2004. Anthracyclins: Molecular Advances and Pharmacologic Developments in Antitumor Activity and Cardiotoxicity. *Pharmacol Rev* 56, 185-228.
- Nabekura, T., Yamaki, T., and Kitagawa, S., 2008. Effects of Chemopreventive Citrus Phytochemicals on Human P-glycoprotein and Multidrug Resistance Protein 1, *E. J. of Pharmacology*, 600, 45-49.
- Olivier, S., Robe, P., and Bours, V., 2006. Can NF-kB be a Target for Novel and Efficient Anti-Cancer Agents?, *Biochemical Pharmacology*, 72, 1054-1068.
- Park, H., Kim, M. J., Ha, E., and Chung, J. H., 2008. Apoptotic Effect of Hesperidin Through Caspase3 Activation in Human Colon Cancer Cells, *SNU-C4, Phytomedicine*, 15, 1-2, 147-151.
- Powell, S. R., and McCay, P. B., 1995. Inhibition of Doxorubicin-Induced Membrane Damage by Thiol Compounds: Toxicologic Implications of a Glutathione-Dependent Microsomal Factor, *Free Radical Biology & Medicine*, 18, 159-168.
- Shehata, M. F., 2005. Rel/Nuclear Factor-kappa B Apoptosis Pathways in Human Cervical Cancer Cells. Review., *Cancer Cell International*, 5, 10-23.
- Simstein, R., Burow, M., Parker A., Weldon, C. and Beckman, B., 2003. Apoptosis, Chemoresistance, and Breast Cancer: Insights From the MCF-7 Cell Model System. *Exp Biol Med.* 228, 995-1003.

- Tokarska-Schlattner, M., Zaugg, M., Zuppinger, C., Wallimann, T., and Schlattner, U., 2006. New Insights into Doxorubicin-induced Cardiotoxicity: The Critical Role of Cellular Energetics, *Journal of Molecular and Cellular Cardiology*, 41, 389-405.
- Yeh, C. C., Kao, S. J., Lin, C. C., Wang, S. D., Liu, C. J., and Kao, S. T., 2007, The Immunomodulation of Endotoxin-Induced Acute Lung Injury by Hesperidin in vivo and in vitro, *Life Sciences*, 80, 1821-1831.
- Zampieri, L., Bianchi, P., Ruff, P., and Arbuthnot, P., 2002. Differential Modulation by Estradiol of P-glycoprotein Drug Resistance Protein Expression in Cultured MCF7 and T47D Breast Cancer Cells, *Anticancer Res.*, 22, 2253-2259.
- Zhang, C., Lu, Y., Tao, L., Su, X., and Wei, D., 2007. Tyrosinase inhibitory effects and inhibition mechanisms of nobiletin and hesperidin from citrus peel crude extracts, *J Enzyme Inhib Med Chem.* 22, 1, 91-98.

*) Korespondensi : Adam Hermawan
Cancer Chemoprevention Research Center UGM Yogyakarta
Phone : +6281 5 7801 1991